



Microscopie de fluorescence résolue à $1\mu\text{m}$, rapide et faible coût Application à la sécurité alimentaire

Jean-Marc Goujon, Serge Mottet, Gilles Salvat, Philippe Fravallo, Luiz Poffo, Ronan Le Page

► To cite this version:

Jean-Marc Goujon, Serge Mottet, Gilles Salvat, Philippe Fravallo, Luiz Poffo, et al.. Microscopie de fluorescence résolue à $1\mu\text{m}$, rapide et faible coût Application à la sécurité alimentaire. 8è colloque national sur le Diagnostic et Imagerie optique en Médecine et Biologie Biophotonique (OPT-DIAG 2012), May 2012, Paris, France. pp.395. hal-00816713

HAL Id: hal-00816713

<https://hal.science/hal-00816713>

Submitted on 23 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Microscopie de fluorescence résolue à 1µm, rapide et faible coût

Application à la sécurité alimentaire

JM Goujon¹, S Mottet¹, G Salvat², P Fravallo³, L Poffo¹, R Le Page¹

¹CNRS, UMR6082 Foton, Université Européenne de Bretagne - 22300 Lannion

²Anses Ploufragan/Plouzané - 22440 Ploufragan

³Faculté de médecine vétérinaire - Université de Montréal - Saint Hyacinthe Qc Canada

Jean-Marc.Goujon@univ-rennes1.fr

Abstract : *proposal of low cost, submicrometer, and fast fluorescence microscopy*

Microarray scanners are now reaching submicron details for fast scan speeds on large surfaces such as microscope slides. Reading times depend on the required resolution.

However, specific applications in food security tend to bring closer to the source the measurements necessary to decision making. For the development of salmonella and listeria on pig carcasses, the measurements taken directly at slaughter need to be interpreted within less than an hour, so that the decision of meat usage in a fresh/cooking circuit does not have significant economic consequence.

We developed a method for marking immediately after impacting carcass, which makes it possible to read fluorescence signals 30 minutes after sampling. However, the sampling method leaves the sample some organic residues, whose irregularities in the thickness and the surface can cause problems in reading and interpretation with conventional scanners.

We propose a method of packaging and reading for the automatic counting of salmonella with fast scanning, adapted to the environment of the slaughterhouse. Detection is carried out by a 488nm excitation and a conventional 520 nm fluorescence detection using a photomultiplier. The assembly proposed uses optical fibers. It provides a resolution close to 0.5 µm, the diffraction limit at 488nm.

1. Introduction

La microscopie de fluorescence fait partie de la panoplie classique des microscopies de laboratoire qu'utilise le biologiste. Cependant, du fait des coûts des équipements et des habitudes, celle-ci n'est que rarement sortie du laboratoire pour accéder au stade industriel, pour la validation de conditions dans des procédés automatisés. Même si des scanners de lames et de biopuce existent pour faciliter le travail du biologiste, la présence de celui-ci est presque toujours requise en contrôle.

Nous allons dans cet article détailler un cas d'utilisation de la microscopie de fluorescence dans l'industrie des viandes, où les besoins d'assurance sanitaire sont importants :

Les salmonelles sont fréquemment impliquées (38.5% des cas confirmés en France en 2009) dans les toxi-infections alimentaires [1]. Des épisodes de salmonelloses humaines associées à la consommation de produits de porc ont été rapportés ces dernières années en Europe et récemment en France [2]. Les analyses les plus récentes expliquent que la contamination des carcasses est, pour 40% associée au statut de porteur des animaux en élevage et, pour 60% le fruit des contaminations croisées au cours du procédé d'abattage et de préparation de la carcasse, avant la découpe [3].

Jusqu'à présent les outils de surveillance de la contamination en production primaire (élevage /abattage) porcine sont bactériologiques ou sérologiques. Une analyse de ces méthodes (EFSA 1) souligne l'absence de complémentarité des approches sérologique et bactériologique pour apprécier le risque *Salmonella* associé à un lot de carcasses, risque qui correspond à la présence concrète de la bactérie. Les acteurs industriels font alors face à la problématique suivante : même avec les méthodes bactériologiques les plus rapides (associant la bactériologie à des techniques moléculaires), l'information sur le statut des carcasses arrive trop tard pour envisager d'appliquer des mesures correctives.

Le cas de l'industrie agro-alimentaire est assez spécifique : cette industrie de gros volume réalise des marges très faibles, les investissements se doivent d'être particulièrement rentables et/ou contraints. Les abattoirs ne peuvent se permettre d'ajouter un opérateur dédié à la surveillance de la qualité bactériologique.

Nous proposons de mettre en place un outil permettant de façon automatisée d'obtenir, par la détection de la bactérie, l'information du niveau de contamination d'un lot de carcasses en cours d'abattage. Nous visons une évaluation « en temps réel » alors compatible avec la gestion de l'assurance de la sécurité des produits alimentaires. Cet outil est destiné en première intention aux industriels mais, mis à disposition des organismes de contrôle des risques alimentaires en France, il permettrait de valider cette maîtrise du risque *Salmonella* en production porcine en temps réel, lot par lot. L'ensemble de l'opération doit être réalisée dans un délai de l'ordre de trois heures (durée du refroidissement) afin de disposer de l'information sur le statut du lot, sans ralentir le processus d'abattage.

2. Marquage

Nous avons mis au point un immuno-marquage [4] qui permet d'identifier des bactéries pathogènes *Salmonella enterica* sur de la couenne de porcs. Pour une application industrielle, il convenait de dimensionner l'unité d'analyse à l'unité de gestion de la production : le lot de carcasses. La technique d'immuno-marquage ne sera donc pas utilisée sur une carcasse mais mise en œuvre sur un capteur biologique que nous souhaitons représentatif de la contamination du lot. Une lame d'inox (de la dimension d'une lame de microscope) a été appliquée sur des carcasses d'un lot. Cette technique d'échantillonnage a été validée en conditions industrielles sur soixante lots de carcasses de porcs. La lame ne se révèle positive que lorsque le lot présente une contamination importante et homogène.

L'optimisation de la méthode d'échantillonnage (nombre d'applications de la lame par carcasse par exemple) et la validation de l'utilisation du marquage pour la détection ne peut être obtenue sans un outil automatisé d'analyse de la surface du capteur. Cet outil n'était jusqu'alors pas disponible, son développement nécessitait de disposer de capteurs artificiellement contaminés. Pour ce programme la fourniture de supports marqués par des *Salmonella* fluorescentes permet l'étude de faisabilité du procédé de lecture (définition des paramètres du signal). Un support était validé lorsqu'il présentait des signaux spécifiques (Figure 1) confirmés au microscope à épifluorescence, éventuellement au milieu de débris (graisse ou particules) déposés par la couenne lors de l'application.

Les supports satisfont les conditions suivantes : (1) avec ou sans bactéries, (2) avec ou sans couenne, (3) avec couenne avec ou sans bactéries.

Les *Salmonella* utilisées sont de sérovar Typhimurium, isolées de production porcine et issues de la collection de l'unité HQPAP de l'Anses de Ploufragan. Les lames sont lavées 5 minutes dans un bain de PBS avant immuno-marquage.

Par ailleurs, et pour atteindre l'objectif de mimer la réalité du support à analyser (présence de graisse et de particules organiques après application des lames sur couenne), le marquage est préalablement réalisé en microtubes sur un culot bactérien. Ce culot est fixé, immunomarké en tube et une fraction est déposée sur la couenne. Le transfert sur le support de la couenne artificiellement contaminée de bactéries marquées est alors réalisé.

Le marquage des bactéries consiste à fixer des anticorps (IgG sériques-SANOFI Pasteur) produits chez le lapin, spécifiques des antigènes de surface O4.5 de *Salmonella* Typhimurium puis à révéler ces anticorps par fixation d'anticorps anti-immunoglobulines de lapin couplés à un fluorochrome (Alexa 488 MolecularProbes). Les solutions d'anticorps utilisées sont systématiquement filtrées sur 0.22 µm.

Sur les images prises au microscope à épifluorescence (figure 1), on constate que des débris (soies du porc, graisses, particules organiques, agrégats de fluorophores) ainsi que les rayures peuvent générer un important signal, interdisant ainsi les analyses quantitatives réalisées par un système collecteur de flux : une analyse de l'image, avec reconnaissance de la forme des bactéries, est indispensable pour le comptage.

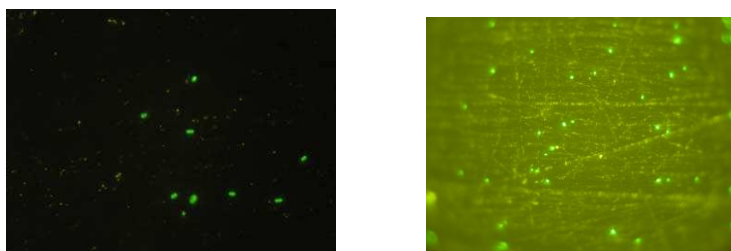


Figure 1 – gauche : immuno-détection de *Salmonella* Typhimurium après immunomarquage Alexa488 sur lames d'inox impactées par de la couenne de porc artificiellement contaminée. Droite : rayures sur lame inox.

Dans le cadre de ce projet, un prototype d'automate réalisant l'impactage, le séquençage des bains de marquage et de filtration, a été réalisé par le lycée Chaptal de Tréguier (figure 2).

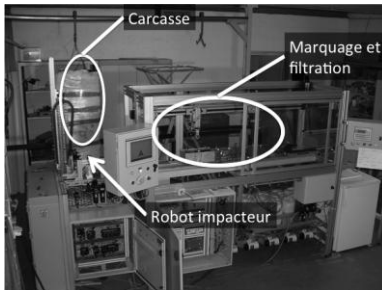


figure 2 - Robot réalisant l'impactage, la séquence des bains de marquage, ainsi que le chargement dans le lecteur microscope à épifluorescence (Doc Lycée Chaptal Tréguier).



Figure 3 - détail d'une chaîne d'abattage.

3. Contraintes sur le lecteur

Initialement, les lames utilisées sont de format 25x75mm. Cependant, en améliorant la collecte de bactéries lors du procédé d'impactage, il est possible de réduire leur taille.

On peut synthétiser ici les principales contraintes qui pèsent sur la définition du lecteur de lames :

- L'impactage, le marquage et le chargement doivent être robotisés, en visant l'insertion dans une chaîne où transitent 800 carcasses par heure.
- L'analyse d'images nécessite une résolution optique meilleure que $1\mu\text{m}$,
- Le temps de lecture des lames doit être inférieur à 5 minutes/lame, la cadence d'acquisition se ramène donc à : $F = (\text{surface lame})/(\text{taille pixel})/\text{temps total}$, soit environ 7 millions d'échantillons/seconde, sur une dynamique de 10 bits (10^3). Cette cadence d'acquisition est accessible couramment par des cartes d'acquisition dédiées, et compatible avec la bande passante des photomultiplicateurs.
- Les lames sont métalliques, comportant des rayures (le verre est proscrit des abattoirs). Cette condition gêne les autofocus de nombreux scanners actuels dédiés aux biopuces.
- Le coût d'investissement doit se situer entre 10 et 15 k€ pour l'acquéreur, soit 4 à 5 fois moins que les premiers scanners de fluorescence pour biopuce en 2012.

Après avoir constaté que les lecteurs disponibles sur le marché ne pouvaient répondre à ces contraintes, nous avons décidé de proposer une architecture spécifique. Les principaux aspects à optimiser sont donc :

- **La détection et acquisition** : il ne s'agit pas ici de quantifier précisément le flux reçu, mais d'effectuer une analyse de forme. On peut donc se limiter à une dynamique de l'ordre de 10^3 , inférieure d'un facteur 10 à celle des systèmes commerciaux.
- **Le balayage et la synchronisation** : plusieurs techniques sont classiquement utilisées pour analyser successivement tous les points de l'échantillon :
 - balayage laser, pour lequel le faisceau est dévié par un miroir en rotation ou oscillant, suivant une ou plusieurs directions,
 - balayage de l'échantillon au moyen de platines motorisées et transducteurs piézo-électriques, la tête optique d'analyse restant fixe.
 - combinaison de ces deux méthodes.

4. Proposition d'architecture

Pour optimiser le paramètre coût, nous proposons une architecture utilisant au mieux les dispositifs de lecture optique « haute résolution » couramment produits en grande série. Parmi ceux-ci, on peut compter les scanners domestiques (qui se limitent à une résolution d'environ 1000 points/pouce, alors que $2,5 \cdot 10^4$ 'dpi' seraient nécessaires) et les lecteurs de disques : CD, DVD, Blu-ray.

Ces derniers sont des systèmes ponctuels dont les résolutions sont respectivement de $1,6\mu\text{m}$ (CD), $0,74\mu\text{m}$ (DVD) et $0,32\mu\text{m}$ (BR).

Lors d'une première approche, nous nous proposons de bâtir un prototype sur l'architecture du lecteur CD, malgré une résolution très légèrement inférieure à l'objectif. Le principe est présenté sur la figure 5. Il consiste à associer une seconde tête optique si possible identique, dédiée à l'excitation et la collecte de fluorescence.

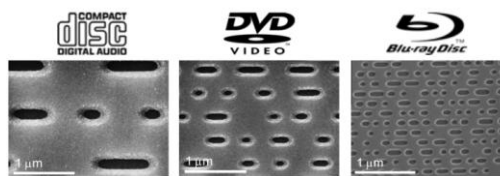


Figure 4 - Vue en microscopie électronique à balayage de la surface des principaux formats de disques de stockage et dimensions caractéristiques (Doc. Philips)

La première tête de lecture lit un CD métallisé jusqu'à la zone des échantillons. Ensuite, le CD n'est plus métallisé, permettant à la seconde tête une lecture de l'échantillon au travers du support.

Sur un CD classique, le système d'asservissement de la tête de lecture réalise lui-même, lors de la lecture, une correction d'autofocus. Cette correction peut être recopiée et appliquée au bloc de lecture des échantillons, pour corriger certains défauts de surface. Cependant, un second étage d'autofocus sera nécessaire [6] pour la correction des défauts locaux pour une fréquence de l'ordre de 1kHz.

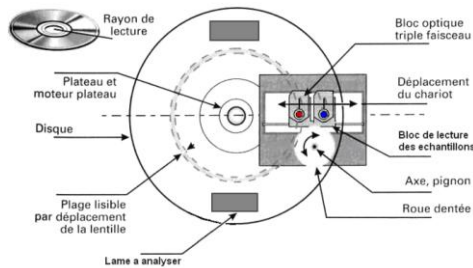


Figure 5 – Principe du balayage et de la synchronisation de la mesure de fluorescence.

En effet, les mouvements verticaux incontrôlés du disque (axial runout) peuvent atteindre 100 μm au cours de la lecture [5]. Les causes sont multiples :

- défaut général de forme du disque (disc waviness),
- problèmes de calage angulaire du disque,
- translation simple du disque due au moteur d'entraînement.

Le principe envisagé ici est de compenser les principaux défauts de calage angulaires et disc waviness, en extrapolation à partir d'une mesure profilométrique prise en un autre point du disque sur le même rayon. La seconde tête est liée mécaniquement, afin de reproduire tous les mouvements de la première. Le second de l'autofocus, situé dans la tête de lecture de fluorescence, permet alors de corriger les défauts de second ordre (défocalisations) constatés.

5. Réalisation

La chaîne de mesure est représentée en figure 6 : elle est constituée d'une excitation par laser à semi-conducteur, amenée par fibre optique monomode sur la tête de lecture. La détection est confocale et périphérique (fibres multimodes périphériques).

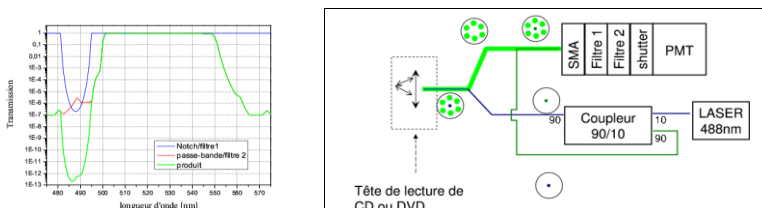


Figure 6 – à gauche : transmission spectrale des filtres. A droite : schéma du dispositif optique.

Le support d'échantillon (figure 7) outre la fonction de blocage, fournit également une surface de référence sur laquelle l'échantillon est comprimé, limitant la profondeur de champ nécessaire à la lecture. Ce support est « clipsé » contre le disque. Des zones d'extrusion sont aménagées pour garantir l'épaisseur de l'échantillon.

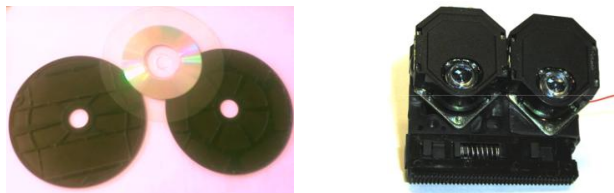


Figure 7 – à gauche : disque partiellement métallisé et supports d'échantillons associés. A droite : prototype 2 têtes de lecture solidaires, dont la seconde a été transformée pour accueillir le dispositif d'excitation – collecte de fluorescence.

6. Conclusion

Nous avons présenté ici un projet combinant un marquage rapide de bactéries pathogènes à une architecture d'imageur en microscopie de fluorescence, en respectant des impératifs de résolution, coût, vitesse de lecture, et type de support. Cet imageur est aujourd'hui en fin de phase de développement. Outre la surveillance en temps réel, le lecteur pourrait voir ses applications étendues en dehors du champ de la microscopie de fluorescence, en variant selon les applications sa résolution et/ou sa vitesse.

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé dans le cadre du projet SalmOK, financé par le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER). Les auteurs tiennent à remercier Zoopôle Développement, pour son support actif lors de ce projet.

Bibliographie

- [1] INVS 03/2011 : Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2009.
http://www.invs.sante.fr/surveillance/tiac/donnees_2009/tiac_donnees_2009.pdf
- [2] Gossner CM, van Cauteren et al, Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Euro Surveill.* 2012 Feb 2;17(5). pii: 20071.
- [3] van Hoek AH, de Jonge R, van Overbeek WM, Bouw E, Pielaat A, Smid JH, Malorny B, Junker E, Löfström C, Pedersen K, Aarts HJ, Heres L, A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of *Salmonella* spp. in a pork slaughter-line, *Int J Food Microbiol.* 2012 Feb 1;153(1-2):45-52.
- [4] Fravallo P, Chanet JP, Mas M, Huchet E, Queguiner S, Salvat G Feasibility of fluorescent detection of pathogens on pork carcasses.. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001 Sep-Oct;114(9-10):393-6.
- [5] Ferry Zijp, Near-Field Optical Data Storage, Phd Thesis, Université de Delft, soutenue le 12 nov 2007.
- [6] JM Goujon, P Guyader, R Le Page, M Billon, P Fravallo, G Salvat, M. Queguiner, C Le Bas, Système d'imagerie par balayage d'une surface d'un échantillon, support et dispositif de lecture correspondants, (29/07/2010) WO2010084193A1 – France.